

A DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Biológiai transzportfolyamatok vizsgálata korszerű
tömegspektrometriás módszerekkel



Katona Mária

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Kémia Doktori Iskola

Vezető: Dr. Inzelt György

Analitikai, kolloid- és környezetkémiai, elektrokémiai program

Vezető: Dr. Záray Gyula

Témavezető: Dr. Takáts Zoltán

2013

1. Bevezetés

Egy molekulából képződő ionra jellemző a tömege és a töltése, ezeknek hányadosa, amely analitikai információt hordoz. A tömegspektrometria (MS) műszerezettségének és érzékenységének fejlődésével egyre inkább megjelent a kutatás és az alkalmazás különböző területein. Köszönhető mindez annak, hogy a vizsgálandó minta lehet gáz, folyadék vagy szilárd állapotú, illetve hogy a minta tömege bárhol megjelenhet, mind az atomokat, mind a fehérjéket jellemző tömegnél, illetve a kettő közötti tömegtartományban is. Jelentőségét kifejezi, hogy Fenn és Tanaka Nobel díjat kapott mivel az elektropray (ESI, Electrospray Ionization) és a mátrixszal segített lézer deszorpciós és ionizációs (MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation) technika megjelenésével lehetőség nyílt makromolekulák vizsgálatára [1, 2]. 2004-től a közvetlen ionizációs technikák megjelenésével a biológiai felületek mintaelőkészítés nélkül vizsgálhatóvá váltak, eképpen a tömegspektrometriás *in vivo* alkalmazás egyre jelentősebbé vált [3].

A tömegspektrométerek elterjedéséhez hozzájárult még, hogy összekapcsolhatóvá vált a gázkromatográfokkal, folyadékkromatográfokkal (HPLC) és kapilláris elektroforézis technikákkal. A tömegspektrometria kezdeti biológiai alkalmazása az 1940-es évekre tehető, amikor állatok szén-dioxid termelését vizsgálták. A széleskörű felhasználást mutatja, hogy újszülöttkori anyagcserezavarok, sejtek fehérje expressziójának mérésére, táplálékok ásványi anyag tartalom meghatározására, gyógyszerek metabolizációjának követésére, stb... használják.

Egy gyógyszer megtervezésekor, előállításakor, fejlesztésénél figyelme veszik azt, hogy annak be kell jutnia a véráramba, elérhetőnek kell lennie a szövetek számára. Egy gyógyszermolekula hatékonysága függ annak felszívódásától, eloszlásától, metabolizmusától, kiválasztódásától és toxicitásától [4]. Felismerték, hogy a metabolizmus függ a sejtekben található un. transzportfehérjék működésétől, azok meghatározzák a gyógyszer a vérbe való felszívódását és szöveti eloszlását [5].

A bőrszövetben megtalálható faggyú- és verejtékmirigyekből kiválasztódó, kiürülő molekulák meghatározása alternatívaként megjelenhet a vér-, plazma- és vizeletvizsgálatok mellett [6].

Doktori munkám során célunk egy érzékeny analitikai módszer fejlesztése volt, amellyel az ABC transzportfehérje szubsztrát ill. inhibitor specificitása széleskörűen vizsgálható. Munkám további célja gyógyszerek és azok metabolitjainak tömegspektrometriás meghatározása volt, amelyek különböző transzportfolyamatok termékeiként jelentek meg patkány illetve humán bőrszöveten.

2. Célkitűzés

A gyógyszerfejlesztés meghatározó eleme a gyógyszer ADME-Tox (felszívódás, eloszlás, metabolizmus, kiválasztódás és toxicitás) paramétereinek ismerete. Ezt kiegészítendő a transzportkutatások következtében ismertté vált, hogy a sejteket körülhatároló membránokat alkotó transzportfehérjéknek alapvető szerepük van a metabolizmus folyamatában. Az egyik hangsúlyos transzporter csoportot a multidrogr rezisztenciáért ABC-transzportfehérjék alkotják. Az ABC-fehérjék farmakológiai szerepüket vizsgálják olyan *in vitro* tesztek, melyek segítségével a kompetitív gyógyszer-gyógyszer és a gyógyszer-transzporter kölcsönhatások meghatározhatóak. A módszerek közül figyelemreméltóak a kifordított (inside out) vezikulákat alkalmazó transzportkísérletek, mivel a vezikula egy olyan lizoszóma amely a vizsgálni kívánt transzportert tartalmazza, azaz lényegesebb egyszerűbb felépítésű mint egy sejt. A hagyományos kvantitatív vezikuláris transzport mérésekhez radioaktív vagy fluoreszcens szubsztrátokat alkalmaznak. Az egyébként közepesen gyors módszer hátránya a kereskedelemben kapható kisszámú izotópjelzett molekula [7].

Célunk egy olyan érzékeny HPLC-MS módszer fejlesztése volt, amellyel az ABC transzporterek szubsztrát illetve inhibitor specificitása széleskörűen vizsgálható. A modellkísérletünkhöz az ABCG2 transzportfehérjét választottuk, mert jól jellemzett, nagy aktivitású transzporter. A transzportfolyamat szubsztrátjaként az ABCG2 már ismert szubsztrátját, a metotrexátot (MTX) választottuk.

A direkt ionizációs technikákat együttesen jellemzik, hogy a minta vizsgálata nem igényel mintaelőkészítést, így az analízis egyszerűbbé válik és annak ideje lényegesen csökken [8]. További célunk volt egy olyan DESI-MS (DESI: deszorpciós elektropray inizáció) módszer fejlesztése, ami meghatározza egy gyógyszermolekula szubsztrát illetve inhibitor tulajdonságát.

Kutatásunk másik célja gyógyszerek és azok metabolitjainak tömegspektrometriás meghatározása volt, amelyek különböző transzportfolyamatok termékeiként jelentek meg patkány illetve humán bőrszöveten. Molekulák vérből bőrfelületre három lehetséges út szerint juthatnak, verejtékkel és/vagy sebummal, intercelluláris diffúzióval a sejtmembrán mentén és transzcelluláris diffúzióval [9]. Az első DESI módszert közlő publikáció bemutatta gyógyszervegyületek kimutatását vér vagy vizelet minta vétele nélkül. Olyan klinikai kémiában használatos tesztek szerettünk volna fejleszteni, ami kiválthatja a vér és vizelet alapú vizsgálatokat.

3. Kísérleti rész

3.1. Az ABCG2 transzporter aktivitásának tömegspektrometriás vizsgálata

A vezikuláris transzport assay vizsgálathoz rekombináns baculo vírusokkal fertőzött Sf9 rovarsejteket használtunk [10]. A vírusok humán ABCG2 transzportfehérjét kifejező cDNS-t tartalmaztak. Így ABCG2 transzportfehérjében gazdag sejtmembránnal határolt rovarsejtek jöttek létre, amelyekből vezikulákat állítottak elő [11]. A kifordított (inside out) vezikula metotrexát ATP-függő felvételét a Jedion Kft. által tervezett és készített gyors szűrőrendszerben vizsgáltuk. A metotrexát (MTX) felvétele 7.0 pH-jú transzport assay pufferben jött létre. Az inkubációs idők letelte után a transzportot jéghideg pufferrel állítottuk meg, majd a vezikulummintát vákuumot alkalmazva 0,45 µm pórusátmérőjű FHLC membrán filterre szűrtük. Ezután a filtert lemostuk, majd a vezikulumot metanol/víz (95/5) eleggyel roncsoltuk. A roncsolás a metotrexát elúcióját eredményezte. Az analízis megbízhatóságának ellenőrzésére belső standardet használtunk. A molekulaszervezetek hasonlósága miatt belső standardnek a folsavat választottuk, amit az eluáló metanol/víz (95/5) elegyhez adtunk.

A szűrőházat és a gyűjtőedényt C18 SPE oszloppal kötöttük össze azzal a céllal, hogy a vezikulumból származó lipideket adszorbeálja, így védtük az elválasztás során használt HPLC C18 oszlop élethosszát illetve C18 tulajdonságát. Az eluátumot bepároltuk, majd a kapott száraz anyagot acetonitril/víz (5/95) elegyben visszaoldottuk. Az ily módon kapott oldat MTX tartalmát HPLC-MS módszerrel vizsgáltuk.

A DESI technika alkalmazásához az inkubációt követően a vezikulumot jéghideg pufferben szuszpendáltuk, majd leszűrtük. A szűrőrendszer felépült az általunk készített szűrőházból és az azzal összekapcsolt polipropilén fecskendő lueres csatlakozójához erősített 0,45 µm pórusátmérőjű FHLC filterből. Az FHLC filter mechanikai stabilitását úgy növeltük, hogy egy 1mm vastag, 20 µm pórusátmérőjű HDPE fritet helyeztünk alá. Az FHLC filterre szűrt vezikulákat pufferrel lemostuk majd a száradásukat követően a MTX transzportját DESI-MS technikával vizsgáltuk.

3.2. Non-invazív bőrvizsgálatok DESI-MS technikával

A human és patkány bőrvizsgálatokhoz használt OmniSpray (Prosolia) DESI ionforrás a kísérleteink során egy LCQ Duo kvadrupol ioncsapda tömegspektrométerhez illetve egy LTQ Orbitrap Discovery Fourier transform tömegspektrométerhez kapcsolódott.

Állatkísérletek

Az állatkísérletek a Semmelweis Egyetem Egyetemi Állatkísérletes Bizottság engedélyével és Az állatok védelméről és kíméléséről szóló 1998. évi XXVII. törvény szellemében zajlottak.

60 mg/kg dózisú intraperitoneális sztreptozotocin injekció hatására cukorbetegséget idéztünk elő. A patkányok farkából származó vérből egy kereskedelembe kapható Accu-Check vércukorszintmérővel állapították meg a vér glükóz koncentrációját. A tömegspektrometriás mérések a sztreptozotocin injekció beadását követően 4 héttel később kezdődtek el.

Közvetlenül a DESI-MS mérések előtt az oxidatív stressz kimutatására 50mg/kg dózisú intraperitoneális dimetil-tiourát injekciót kaptak. Ezután négy napon keresztül egy bőr alá ültetett ozmótikus minipumpából óránként 33 µg/kg dózisú Angiotenzin II jutott a szervezetükbe. A DESI-MS kísérletek során a patkányokat elaltattuk 50 mg/kg dózisú intraperitoneális ketaminnal és 10 mg/kg dózisú xylazinnal vagy 35 mg/kg dózisú intraperitoneális pentobarbitállal.

4. Eredmények és értékelés

4.1. Vezikuláris transzportvizsgálatok

1. HPLC-MS módszerfejlesztés

a) Munkám első lépéseként olyan tömegspektrometriás módszert fejlesztettem ki, amelynek segítségével a modellvegyületként használt metotrexát nagy pontossággal és megfelelő érzékenységgel kimutatható. A MS analízis Selected Reaction Monitoring (SRM) módban a metotrexát esetében 455-308 és a folsav (belső standard) esetében 442-295 átmenet szűrésével zajlott.

b) A tömegspektrometriás módszer beállítását követően elvégeztem a folyadékkromatográfiás módszerfejlesztést. Savas (0.1% ecetsav) pH mellett vizsgáltam a kimutatandó komponensek viselkedését víz/acetonitril (ACN) gradiens esetében, 5% ACN/ 95% víz → 70 % ACN gradiens tartományt használva. A módszer kimutatási határa 0.2 ng/ml volt és a módszer lineárisnak bizonyult az 5 – 1000 ng/ml tartományban.

2. Mintaelőkészítés: Szűrőház fejlesztés, vezikulák roncsolása

A munkám második szakaszában az optimális szűrőmembránnal ellátott rendszert állítottunk össze és a mintaelőkészítés protokollját kidolgoztuk.

a) A visszanyerés mérésekben tapasztalt eredmények miatt a vezikulákra szűrésére a politetrafluoretilén (PTFE, köznapi nevén Teflon) membránt választottam.

b) További visszanyerési kísérletek szerint a metotrexát és a folsav egy része irreverzibilisen adszorbeálódik a polipropilén szűrőház és a membrán alátét felületén. A 100%-os visszanyerés érdekében egy saválló acélból készült szűrőházat terveztünk a Jedion Kft. munkatársainak a segítségével.

c) A kiszűrt vezikulákat folsavat tartalmazó 95/5 metanol/víz eleggyel roncsoltam és ennek eredményeként eluáltam a MTX-ot.

d) A módszer megbízható reprodukálhatóságának és a HPLC oszlop kémelésének érdekében szilárd fázisú extrakciót (C18 SPE oszlop) alkalmazva a vezikulák lipid komponenseit kiszűrtem az eluátumból.

3. A kidolgozott HPLC-MS módszerrel meghatároztam a transzportfolyamat idő és koncentrációfüggését amelyek jó egyezést mutatnak az irodalmi értékekkel. A transzport Michaelis állandója (K_m) 580 μM -nak és maximális sebessége (V_{\max}) 2800 pmol/mg/percnek adódott.

4. DESI-MS módszerfejlesztés

A laboratóriumunkban használt DESI-MS technika ismeretében célszerűnek tűnt a vezikuláris transzportfolyamat DESI-MS vizsgálata.

a) Meghatároztuk az ideális DESI oldószer összetételét, ami MeOH/víz (1/1) lett.

b) Megterveztük és kiviteleztük a mintaelőkészítéshez szükséges berendezést. A szűrőmembránt egy 1mm belső átmérőjű, konkáv luer külső geometriájú polipropilén csőre rögzítettük, majd ehhez egy konkáv luer belső geometriájú elemet rögzítettünk, és ezen keresztül vittük fel a vezikulákat tartalmazó mintát. Ilyen módon a vezikulák egy 1 mm átmérőjű, kör alakú területen koncentráálódtak, melynek DESI vizsgálata nem igényelte a minta mozgását.

c) A transzportfolyamatot megvizsgáltuk ATP, ATP és az ABCG2 fehérje inhibitorának jelenlétében, illetve egy olyan transzport assayben ami sem ATP-t, sem az inhibitort nem tartalmazta. Az eredmények azt mutatják, hogy a transzport végbemenetele

egyértelműen kimutatható, sőt, az inhibitor jelenlétében meglevő reziduális aktivitás is megkülönböztethető volt az ATP hiányában egyáltalán nem lejátszódó transzport esetétől.

d) A DESI-MS módszerrel emellett megvizsgáltuk a transzport időfüggését is és a várt eredményt kaptuk, amely hasonlít a HPLC-MS (ill. szcintillációs) módszerrel mért görbére, csak a szórásértékek nagyobbak mintegy egy nagyságrenddel.

Az eredmények jól mutatják, hogy a DESI módszer alkalmas a transzport folyamatok szemi-kvantitatív vizsgálatára, amely különösen előnyös lehet nagy mintaszámú tanulmányoknál.

4.2. Bőrfelület vizsgálata DESI-MS technikával

A szabad emberi bőrfelület közvetlen tömegspektrometriás vizsgálatának a lehetőségét a DESI technika kifejlesztése tette lehetővé [3].

1. Munkavédelmi szempontok figyelembevételével a DESI ionforráshoz egy PTFE-ből készült keretet fejlesztettek ki a Jedion Kft. munkatársai. A keret lehetőséget biztosít mintegy 5 mm átmérőjű szabad bőrfelület DESI tömegspektrometriás analízisére. Továbbá az áramütés veszélyét olyan módon oldottuk meg, hogy a nagyfeszültségű áramkörbe 4 G Ω -os ellenállást építettünk, amely 1 μ A alá csökkenti az áramkörön keresztül folyó áram erősségét 4 kV nagyfeszültség beállítás esetében. A tömegspektrométer kapilláris bemenetét egyszerűen meghosszabbítottuk 4 cm-rel, ami ugyan minimális (<15%) érzékenységsökkenéshez vezet, viszont egyszerűbbé teszi a mintavételt, és – tekintettel a saválló acél meglehetősen rossz hővezető képességére – kiküszöböli az esetleges égési sérüléseket. További módosításként a szokásosan használt metanol-víz elegyet etanol-víz elegyre cseréltük.

2. A kísérletek első szakaszában a bőrfelületet, mint DESI mintahordozót vizsgáltuk. A vizsgálatok során rodamin 6G és bradikinin vizes-etanolos oldatait cseppentettünk föl az önkéntesek mutatóujjára, különböző koncentrációban. Az LOD (Limit of Detection) és LLOQ (Lower Limit of Quantification) értékek minden esetben az 1 μ g/mm² érték alatt volt, továbbá a módszer lineárisnak bizonyult 2-3 nagyságrend széles tartományban.

3. Megvizsgáltuk az önkéntesek mutatóujj bőrfelületét pozitív és negatív ionmódban. A kapott tranziens jelek jellemzően különféle tárgyak megérintésekor vagy kozmetikumok alkalmazásakor a bőrre kerülő molekulákhoz, amíg konstans módon megjelenő jelek a bőr mirigyei által kiválasztott komponensekhez tartoznak.

4. A bőrfelületről kimutatott vegyületek eredetének meghatározására bőrfelületről dohányzás előtt és után, illetve nem dohányzó önkéntes dohánylevéllel bedörzsölt ujjáról nikotint mértünk. A kísérletekből jól látható, hogy amíg a bőrfelületre „dörzsölt” nikotin jele percek alatt a kimutatási határ alá eszik, addig a szervezet által kiválasztott nikotin – lényegében a nikotin farmakokinetikai sajátosságait követve – folyamatosan jelen van a bőrfelületen.
5. A nikotin hidrófil tulajdonságával szemben, egy hidrófób, lipidoldható, azaz székummal kiválasztódó komponens, a propofol mutattuk ki bőrfelületről. A propofol fél-életidejét 7-8 órának határoztunk meg.
6. Ketamin/xilazin intravénás adagolásával elaltatott Wistar patkányok talpáról felvett DESI tömegspektrumok alapján meghatározható a ketamin farmakokinetikai görbéje. A tömegspektrumokban a ketaminhoz tartozó molekulaion mellett a kreatininhez tartozó ion is megtalálható, melyet belső standardként használtunk a mérés értékelésekor. Az altatás kezdetétől tíz perces mintavételi idővel vettünk fel tömegspektrumokat, illetve az állatok farkából vett vér ketamin/kreatinin összetételét HPLC-MS módszerrel határoztuk meg. A két módszerrel meghatározott farmakokinetikai görbe jó megegyezést mutat.
7. Modellítettük akut és krónikus oxidatív stresszes állapotokat Wistar patkányok talpáról felvett N,N'-dimetil-tiokarbamid tömegspektrumok segítségével. Az eredmények jól mutatják, hogy az oxidatív stresszes állapot nem az iszkémiás, hanem a reperfüziós esemény után következik be, azaz amikor az oxigénhiányos állapotban tartott szívizom újra oxigénben gazdag vérhez jut.

5. Következtetések

Doktori munkámban biológiai transzportfolyamatokat vizsgáltam tömegspektrometriás technikákkal.

Az ABCG2 transzportert tartalmazó vezikulákat felhasználó modellkísérletünkben fejlesztett szűrőrendszer és HPLC-MS technika a kinetikai mérések alapján alkalmas az ABC transzporterek szubsztrát illetve inhibitor specificitásának széleskörű vizsgálatára. A módszerhez nem szükséges izotópjelzett vegyületek használata, ami jelentősen növeli a munkabiztonságot a korábbi szcintillációs módszerrel szemben. Gyógyszermolekulák szubsztrát illetve inhibitor tulajdonságának high-throughput vizsgálatára a jövőben fejleszthető egy 96 lyukú lemezt (96 well plate) használó szűrőrendszer. A DESI-MS módszer szemben a HPLC-MS és a szcintillációs mérésekkel lényegesebb gyorsabb, ugyanakkor szemi-kvantitatív tulajdonsága miatt inkább a nagy mintaszámú minták vizsgálatára alkalmas.

A fent leírt intakt, in-vivo bőrvizsgálatok szerint a szükséges validálási eljárásokat követően a non invazív DESI-MS bőranalízis alternatív technika lehet a vér-, plazma- és vizeletvizsgálatok mellett mind a klinika kémiai, mind az igazságügyi orvostani analitikában.

6. Irodalomjegyzék

1. Jürgen H. Gross, Mass Spectrometry 2nd Edition, Springer, p.6-12.
2. Edmond de Hoffmann, Vincent Stroobant, Mass Spectrometry, Wiley, p.11-14.
3. Takats Z. et al., Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization. *Science* 2004.: **306** p.471-473.
4. Li AP., Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. *Drug discovery today* 2001: **6**(7) p.357-366.
5. Williams, J.A. et al., *In vitro* ADME phenotyping in drug discovery: current challenges and future solutions. *Current opinion in drug discovery and development* 2005.: **8** p.78-88
6. G. Skopp et al., Perspiration versus saliva –basic aspects concerning their use in roadside drug testing. *Int J Legal Med* 1999. **112** p.213–221.
7. Gergely Szakács et al. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug discovery today* 2008.: **13**(9) p.379-393
8. Takats Z. et al., Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization. *Science* 2004.: **306** p.471-473.
9. Howard L. Johnson et al., Drug excretion in human eccrine sweat. *The Journal of Investigative Dermatology* 1971.: **56**(3) p.182-188.
10. Özvegy L. Cs. et al., Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001.:**285** p.111-117
11. Sarkadi B. et al., Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase *J. Biol. Chem.* 1992.: **267** p.4854-4858.

7. A témában megjelent saját közlemények

Intact skin analysis by desorption electrospray ionization mass spectrometry

Mária Katona, Júlia Dénes, Réka Skoumal, Miklós Tóth and Zoltán Takáts

Analyst 136(4): 835-840

2011

A mass spectrometry based functional assay for the quantitative assessment of ABC transporter activity

Katona M, Kiss K, Angyal V, Kucsma N, Sarkadi B, Takáts Z, Szakács G.

Rapid Communications in mass spectrometry 23(21): 3372-3376

2009